

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **2000004881 A**

(43) Date of publication of application: **11.01.00**

(51) Int. Cl

C12N 15/09
// A61K 31/70
A61K 38/00

(21) Application number: **10174599**

(22) Date of filing: **22.06.98**

(71) Applicant: **OTSUKA PHARMACEUT
FACTORY INC**

(72) Inventor: **YAGUCHI HIROSHI
OBATA HIDEKI**

(54) NUCLEIC ACID BASE-BINDING OLIGOMER

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new nucleic acid base-binding oligomer which has a base sequence which is complementary to a partial base sequence of a gene coding for human stem cell factor(SCF), suppresses the biosynthesis of SCF, and can be used, for example, as an antiallergic agent and an antiinflammatory agent.

SOLUTION: This is a new nucleic acid base-binding oligomer which has a base sequence part which is

complementary to at least a partial base sequence of a gene coding for human stem cell factor(SCF), has an action of specifically suppressing the biosynthesis of human SCF, and its useful, for example, as an antiallergic agent and an antiinflammatory agent. This oligomer is obtained by synthesizing a base sequence which is complementary to the 1st to 7th codons of human SCF gene from (chemically modified) deoxyribonucleic acids, for example, using an automatic synthesizer.

COPYRIGHT: (C)2000,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-4881

(P2000-4881A)

(43) 公開日 平成12年1月11日 (2000.1.11)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B 0 2 4
// A 6 1 K 31/70	A B F	A 6 1 K 31/70	A B F	4 C 0 8 4
38/00	A B E	37/02	A B E	4 C 0 8 6
	A D A		A D A	

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平10-174599

(22) 出願日 平成10年6月22日 (1998.6.22)

(71) 出願人 000149435

株式会社大塚製薬工場

徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原115

(72) 発明者 矢口 寛

徳島県鳴門市撫養町立岩字五枚187

(72) 発明者 小島 秀樹

徳島県鳴門市瀬戸町明神字下本城208-16

(74) 代理人 100065215

弁理士 三枝 英二 (外10名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸塩基結合オリゴマー

(57) 【要約】

【課題】 ヒトシステムセルファクター (S C F) の生合成を選択的に抑制 (阻害) する作用を有し、抗アレルギー剤、抗炎症剤等として有用な核酸塩基結合オリゴマーを提供。

【解決手段】 例えばヒト S C F をコードする遺伝子の第3～7コドンに対して相補的な配列を有するDNA、ペプチド核酸等の核酸塩基結合オリゴマー。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトのステムセルファクターをコードする遺伝子の少なくとも一部の塩基配列に相補的な塩基の配列部分を有することを特徴とする核酸塩基結合オリゴマー。

【請求項2】 ヒトのステムセルファクターをコードする遺伝子の少なくとも一部の塩基配列が、該遺伝子の第3～7コドンである請求項1に記載の核酸塩基結合オリゴマー。

【請求項3】 ヒトのステムセルファクターをコードする遺伝子の少なくとも一部の塩基配列が、配列番号：1に示されるものである請求項1に記載の核酸塩基結合オリゴマー。

【請求項4】 DNA形態を有する請求項1～3のいずれかに記載の核酸塩基結合オリゴマー。

【請求項5】 DNA形態が、これを構成するリン酸ジエステル結合がヌクレアーゼによる分解を受けない化学修飾を施されたものである請求項4に記載の核酸塩基結合オリゴマー。

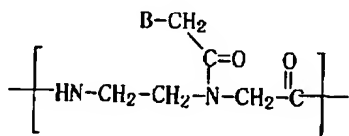
【請求項6】 化学修飾が、ホスホロチオエート化である請求項5に記載の核酸塩基結合オリゴマー。

【請求項7】 式d-C※p(s)C※p(s)A※p(s)A※p(s)G※p(s)T※p(s)T※p(s)T※p(s)G※p(s)T※p(s)G※p(s)T※p(s)C※p(s)T※p(s)T※p(s)C※p(s)A※p(s)T※

〔式中、dはデオキシリボヌクレオシド単位から構成されることを示し、C※は2'-デオキシシチジンを、T※は2'-チミジンを、G※は2'-デオキシグアノシンを、A※は2'-デオキシアデノシンをそれぞれ示し、p(s)はホスホロチオ酸による5'位と3'位との結合手を示す。〕で表わされるユニットを有する請求項6に記載の核酸塩基結合オリゴマー。

【請求項8】 ペプチド核酸形態を有する請求項1～3のいずれかに記載の核酸塩基結合オリゴマー。

【請求項9】 ペプチド核酸形態が、繰返し単位【化1】



〔式中、Bは核酸塩基を示す。〕で表わされるポリアミド骨格を有するものである請求項8に記載の核酸塩基結合オリゴマー。

【請求項10】 繰返し単位中のBの配列が、ヒトのステムセルファクターをコードする遺伝子の第3～7コドンに相補的な配列である請求項9に記載の核酸塩基結合オリゴマー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規な核酸塩基結合オ

リゴマー、より詳しくは肥満細胞の遊走、接着、分化増殖因子であるステムセルファクター（Stem cell factor、以下SCFという）遺伝子、特にヒトのSCF遺伝子の、少なくとも1部の塩基配列に相補的な塩基の配列部分を含み、SCFのmRNAとハイブリダイズしてSCF生合成を選択的に抑制（阻害）する作用を有し、例えば抗アレルギー剤や抗炎症剤等として有用な、新しい核酸塩基結合オリゴマーに関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、アトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー疾患は、成人患者数の増加と難治化の面より、我国において社会問題となってきた。かかるアレルギー疾患における炎症症状の慢性化は、特にその抑制が望まれる重要な課題である。

【0003】 現在、アレルギー性皮膚炎の治療剤としては、一般的にステロイド外用剤が用いられてきている。該ステロイド外用剤は、症状緩和の点で後述する他の各種薬剤よりも優れているため、第1選択の薬剤として幅広く用いられている。しかしながら、ステロイド外用剤は、周知の通りその副作用が臨床現場でしばしば問題とされている。またその長期使用によればむしろ症状が悪化するケースがある旨の報告もなされている。従って、該ステロイド外用剤は、上記の点でアレルギー疾患の治療剤としては、尚改善される余地があり、満足できない。

【0004】 上記ステロイド外用剤以外の薬剤としては、抗アレルギー剤が知られている。該抗アレルギー剤は、アレルギー反応の反応相を次の3つに分け、各反応相を標的とするものに分類される。即ち、アレルギー反応において、IgE抗体の産生誘導からFcεRとの結合までを第一反応相、IgEとFcεRとの結合から起炎症性化学伝達物質の誘導までを第二反応相、遊離された各種起炎症性化学伝達物質と標的組織細胞の当該受容体との反応から実際のアレルギー炎症までを第三反応相として、上記第一反応相を標的とする薬剤には、例えばトシル酸スプラタスト、DSCG等が、第二反応相を標的とする薬剤には、例えばトラニラスト等の酸性型抗アレルギー剤や、ケトチフェン等の塩基性型抗アレルギー剤が、また第三反応相を標的とする薬剤には、例えば抗ヒスタミン剤や抗ロイコトリエンR等が、それぞれ包含される。

【0005】 之等の抗アレルギー剤は、主として掻痒の軽減や症状の安定化を目的として用いられているが、その殆どは、上記各反応相において炎症症状に関与する様々な炎症メディエーターの内のいずれか一つの機能を抑制する作用を有するものでしかない。しかるに、実際の炎症の症状は、様々な炎症メディエーターの機能の総和として現われてくるので、その内の一つを抑える薬剤では、尚炎症症状を十分に抑制することは困難である。

【0006】 上記のようなアレルギー疾患治療の現状を打破するために、副作用が少なく、作用メカニズムが明

確であり、しかも様々な炎症メディエーターの抑制を同時に可能とする新しい抗アレルギー剤の研究開発が、現在精力的に行なわれているが、いまだ満足すべき薬効を奏し得る薬剤は開発されるに至っていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、その作用メカニズムが明確であり、様々な炎症メディエーターを同時に抑制する作用を奏し得、しかも副作用の少ないアレルギー疾患の治療及び予防剤を提供できる、新しい活性物質を提供することにある。

【0008】本発明者は、上記目的より鋭意研究を重ねた。特に、アトピー性皮膚炎等の I 型アレルギーの皮膚炎では、局所において肥満細胞が分化増殖しており、それが様々な炎症メディエーターを放出するという事実に着目し、該肥満細胞の分化増殖を抑制することができれば、皮膚炎症状、特に I 型アレルギーの遅発反応（慢性炎症）の軽減につながるという見地より、研究を進めた。

【0009】その課程において、ヒトの肥満細胞の分化増殖には、唯一 SCF がその因子として大きく関与しているとの報告 [J. Immunol., 148, 772 (1992)] に注目し、該 SCF の合成阻害、例えば該 SCF をコードする遺伝子から生成される mRNA の蛋白質への翻訳を阻害すれば、SCF 産生を抑制でき、かくして皮膚炎症の機構の根本である肥満細胞の分化増殖を抑制できるとの着想から更に研究を重ねた。その結果、SCF 遺伝子由来の mRNA の機能を妨害する作用を有する新しい特定の塩基配列を有するオリゴマーを見出だすと共に、該オリゴマーが実際に SCF の合成を阻害し、アレルギー疾患の治療及び予防に有用であることを見出し、ここに本発明を完成するに至った。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、ヒト SCF をコードする遺伝子（ヒト SCF 遺伝子）の少なくとも一部の塩基配列、殊に、該遺伝子の第 3～7 コドンの塩基配列又は配列番号：1 に示される塩基配列、に相補的な塩基の配列部分を有することを特徴とする核酸塩基結合オリゴマーが提供される。

【0011】上記核酸塩基結合オリゴマーには、まず第一に、DNA 形態を有するもの、殊に、DNA を構成するリン酸ジエステル結合（以下単に「リン酸結合」という）がヌクレアーゼによる分解を受けない化学修飾が施されたもの、より好ましくは該化学修飾がホスホロチオエート化であるものが包含される。その代表例としては、式（1）：

d-C※p(s) C※p(s) A※p(s) A※p(s) G※p(s) T※p(s) T※p(s) T※p(s) G※p(s) T※p(s) G※p(s) T※p(s) C※p(s) T※p(s) T※p(s) C※p(s) T※p(s) T※p(s) C※p(s) A※p(s) T※

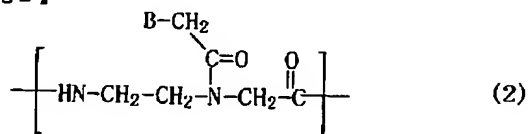
〔式中、d はデオキシリボヌクレオシド単位から構成さ

れることを示し、C※は 2'-デオキシシチジンを、T※は 2'-チミジンを、G※は 2'-デオキシグアノシンを、A※は 2'-デオキシアデノシンをそれぞれ示し、p(s) はホスホロチオ酸による 5' 位と 3' 位との結合手を示す。〕で表わされるユニットを有するものが例示できる。

【0012】上記核酸塩基結合オリゴマーには、また、ペプチド核酸形態を有するもの、殊に、繰返し単位（2）：

10 【0013】

【化 2】



【0014】〔式中、B は核酸塩基を示す。〕で表わされるポリアミド骨格を有するものが包含される。その代表例としては、上記繰返し単位中の B の配列が、ヒト SCF 遺伝子の第 3～7 コドンに相補的な配列であるものが提供できる。

【0015】本明細書において、ヒト SCF 遺伝子の塩基配列は、マーチンら [Cell, 63 (1), 203 (1990)] によって報告されたそれに従うものとする。かかる塩基配列及びその他の略号による表示は、IUPAC-IUB の規定 [IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)]、〔塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン〕（特許庁編）及び当該分野における慣用記号に従うものとする。

30 【0016】また本明細書において、核酸塩基結合オリゴマーとは、核酸を構成する塩基（A、T、G 及び C）の複数個が、リン酸結合やペプチド結合により結合してなる鎖状分子を構成する各繰返し単位のそれぞれに結合して、塩基配列を形成している化合物をいう。該オリゴマーには、上記した通り、鎖状分子を構成する繰返し単位が糖である DNA や RNA の形態を有するもの（リン酸結合によるもの）と共に、鎖状分子を構成する繰返し単位がアミノ酸であるペプチド核酸（ペプチド結合によるもの）の形態を有するものが包含される。その長さ

40 は、得られるオリゴマーが、ヒト SCF 遺伝子の mRNA 転写物の少なくとも一部に対して相補的な塩基の配列部分を有し、これに基づいてヒト SCF の生合成を阻害する作用を奏し得ることを前提として、特に限定的ではない。

【0017】本発明核酸塩基結合オリゴマーは、DNA 形態及びペプチド核酸形態のいずれを有する場合にも、その構成塩基の配列が、ヒト SCF 遺伝子の少なくとも一部の塩基配列に相補であることを特徴とし、これに基づいて、ヒト SCF 遺伝子（コーディング鎖）に特異的にハイブリダイズし得る特徴を有する。この特徴は、

50

またヒトSCF遺伝子のmRNA転写物に対しても同様に相補的であり、該転写物に対しても特異的にハイブリダイズし得ることを意味する。従って、本発明核酸塩基結合オリゴマーは、このmRNAとのハイブリダイズによって、該mRNAの生物学的機能を妨害し、例えばmRNAの蛋白質への翻訳等を遮断し、かくして、SCF生合成を阻害する作用を奏し得る。

【0018】

【発明の実施の形態】以下、本発明核酸塩基結合オリゴマーにつき、これをDNA形態を有するものと及びペプチド核酸形態を有するものに大別して、順次詳述する。

【0019】まず、DNAの形態を有する本発明核酸塩基結合オリゴマーには、DNA自体の他、該DNAのリン酸結合がヌクレアーゼによる分解を受けない化学修飾、例えばホスホロチオエート化を施されているものが包含される。

【0020】上記DNA形態を有する本発明核酸塩基結合オリゴマーは、これをそのまま、生体内投与に適した薬剤形態に調製して、生体に投与することによって、所望のSCF合成阻害効果を奏し得る。特に、上記化学修飾されたDNA形態を有する本発明核酸塩基結合オリゴマーは、体内ヌクレアーゼにより分解されて失活するおそれがないため、より確実に、所望のSCF合成阻害効果を奏し得る利点がある。

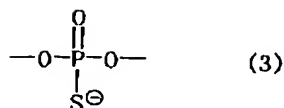
【0021】上記化学修飾の方法としては、例えばホスホロチオエート化する方法、ホスホロジチオエート化する方法、アルキルホスホネート化する方法等、より好ましくはホスホロチオエート化する方法が挙げられる。之等化学修飾の方法は、一般的な各種の方法に従い実施することかできる。例えばホスホロチオエート化は、Gen e, 72, 343 (1988)等により、ホスホロジチオエート化は、Nucleic Acids Res., 19(21), 5843(1991)等により、またアルキルホスホネート化は、Nucleic Acids Res., 6(9), 3009(1979)等により、それぞれ実施することができる。尚、上記化学修飾は、原料とする各デオキシリボ核酸について実施することもでき、之等を常法に従い結合させて得られるポリヌクレオチドについて実施することもできる。

【0022】上記化学修飾されたDNA形態の本発明核酸塩基結合オリゴマーの好ましい一具体例としては、例えば上記式(1)で表わされるユニットを有するものを例示できる。

【0023】尚、上記式(1)に示されたホスホロチオ酸による5'位と3'位との結合手とは、下式(3)で示される結合手を意味し、この結合手により結合されたDNAをホスホロチオエート型という。

【0024】

【化3】



【0025】上記ホスホロチオエート型の本発明核酸塩基結合オリゴマーは、体内ヌクレアーゼによる分解を実質的に受けないものであり、所望のSCF合成阻害効果を常に安定して確実に発揮できる点より特に好ましい。

【0026】上記式(1)で示される好ましい本発明核酸塩基結合オリゴマーは、ヒトSCF遺伝子の第1～7コドンに対して相補的な塩基配列を有しているが、本発明核酸塩基結合オリゴマーの塩基配列は、特にこれに限定されず、ヒトSCF遺伝子の少なくとも一部の塩基配列に相補的なものであればよい。即ち、本発明核酸塩基結合オリゴマーがヒトSCF遺伝子とハイブリダイズしてその発現を抑制できるものであればよい。該塩基配列の好ましいものとしては、ヒトSCF遺伝子の第3～7コドンの塩基配列に対して相補的なものを挙げるができる。

【0027】本発明核酸塩基結合オリゴマーはまた、例えば上記ヒトSCF遺伝子の第3～7コドンに相補的な塩基配列をその最小必須ユニットとして、該ユニットの前後にA、T、C及びGを核酸塩基とするデオキシリボ核酸又はそれらのポリマー、即ちポリヌクレオチド(DNA配列)を付加されたものであってもよい。かかる付加的配列はSCF遺伝子のDNA配列と同じであってもよいし、異なるものであってもよい。また、上記付加的配列は、最小必須ユニットを構成する配列と同様に、例えばホスホロチオエート型等の化学修飾されたものであってもよく、ループ構造をもつものであってもよい。

【0028】尚、本発明核酸塩基結合オリゴマーの有する塩基配列の長さは、得られるオリゴマーの特徴、特にSCF合成阻害の効力、安定性、細胞内への取込まれ易さ、コストや、合成、精製の容易さ等を考慮して、適宜決定でき、特に限定されるものではない。通常、上記した好ましい本発明核酸塩基結合オリゴマーのとり塩基配列の長さを必須として、それ以上、即ち該塩基配列を含むものであればよい。

【0029】上述したDNA形態の本発明核酸塩基結合オリゴマーは、デオキシリボ核酸乃至化学修飾されたデオキシリボ核酸を原料として、従来より知られている各種の方法、例えば自動シンセサイザーを用いる方法等により簡便に製造できる。また、例えばスティックらの方法[J. Am. Chem. Soc., 106, 6077 (1984); J. Org. Chem., 50, 390 (1985)]を参照して製造することもできる。

【0030】上記方法においては、市販の試薬や原料を全て用いることができ、必要に応じて市販の試薬を常法に従い適当に誘導体化して、例えば化学修飾、保護基の付加、活性化等を行なって、用いることができる。

【0031】次いで、ペプチド核酸形態の本発明核酸塩基結合オリゴマーにつき詳述すれば、該ペプチド核酸形態の本発明オリゴマーは、総じて、DNA形態のそれに比して、相補的配列を有するDNAやRNA鎖により強く結合する性質を有しており、しかも体内ヌクレアーゼやプロテアーゼによって分解されない特徴をも有しており、これらの点で抗アレルギー剤等のSCF合成阻害剤としての用途により好適である。

【0032】本発明核酸塩基結合オリゴマーのとり得るペプチド核酸形態としては、従来知られている各種のモノマー単位からなるペプチド鎖のいずれであってもよい。その好ましい一つのモノマー単位としては、例えば文献[J. Am. Chem. Soc., 114(5), 1985 (1992)]に記載の、前記式(2)で表わされるポリアミド骨格をその繰返し単位(ユニット)とするものを例示することができる。

【0033】該繰返し単位を有する本発明ペプチド核酸形態の核酸塩基結合オリゴマー中、特に好ましいものとしては、該繰返し単位中のBの配列が、ヒトSCF遺伝子の第3～7コドンに相補的な配列であるものを例示で

きる。

【0034】かかるペプチド核酸形態の本発明結合オリゴマーにおける式(2)で示される繰返し単位中のBの配列は、これがその一部分にヒトSCF遺伝子の配列、特にコーディング鎖の部分配列に相補的な配列を含む限り、該配列のみからなるものであっても、また該配列の前後に、更に任意の1又は複数の塩基を有するモノマーを付加されたものであってもよい。該付加的ペプチド核酸塩基の配列は、A、T、C及びGの単独又は之等の組合せであることができ、これは特にヒトSCF遺伝子の配列に相補的な塩基配列である必要はない。その配列及び長さは、得られるオリゴマーの効力、安定性、細胞内への取込まれ易さ、コスト、合成や精製の容易さ等を考慮して適宜決定できる。

【0035】上記ペプチド核酸形態の本発明核酸塩基結合オリゴマーは、まず各核酸塩基を結合させたモノマーを製造した後、之等のモノマーを、従来より知られている一般的なペプチド合成方法に従って、反応させることにより実施できる。例えば固相合成法に従い、自動シンセサイザーを用いて、所定の配列となるように反応させればよい。上記モノマーの製造法は、既に知られている[例えばWO96/40685号公報参照]。

【0036】尚、上記方法においては、市販の試薬や原料を全て用いることができ、必要に応じて市販の試薬を常法に従い適当に誘導体化して、例えば原料とするアミノ酸の反応に関与しないN末端、C末端、側鎖官能基等の保護反応を行なって、用いることができる。

【0037】かくして得られる本発明核酸塩基結合オリゴマーは、これがDNA形態を有する場合も、ペプチド核酸形態を有する場合も、通常分離手段により容易に

単離精製できる。かかる手段としては、例えば高速液体クロマトグラフィー、電気泳動クロマトグラフィー、溶媒抽出、塩析等を例示できる。

【0038】本発明核酸塩基結合オリゴマーは、SCF mRNAにハイブリダイズし、該mRNAの通常の機能を妨害し、SCF(蛋白質)の産生を阻害乃至抑制する作用を有している。従って、これは、皮膚組織において肥満細胞の増加がみられる皮膚疾患、特に肥満細胞症やアトピー性皮膚炎等のI型アレルギー疾患の治療及び予防に有用である。また、本発明核酸塩基結合オリゴマーは、比較的少量で所望の薬効を示し、標的蛋白質のみに特異的に効果を発揮するので、副作用が極めて少なくその使用が安全である利点もある。

【0039】本発明核酸塩基結合オリゴマーは、之等を有効成分として通常の製剤担体と共に用いて、一般的な医薬製剤組成物の形態とされ実用される。該製剤担体としては製剤の使用形態に応じて、通常使用される溶解液、充填剤等の希釈剤乃至賦形剤を例示できる。これらは得られる製剤の投与単位形態に応じて適宜選択使用される。上記医薬製剤組成物の形態としては、各種形態が治療目的に応じて選択でき、その代表的なものとしてはイオントファレシス、ソノフォトシス、遺伝子銃等のデバイスが必要とするものを含む経皮吸収製剤や、ネブライザー等を使用した経気道吸収製剤を、好適なものとして例示できる。また、その他の形態としては、経口剤形態、注射剤形態、坐剤形態等が挙げられる。之等の各種形態への調製は、通常の方法に従い行なうことができる。

【0040】DNA形態の本発明核酸塩基結合オリゴマーの場合は、とりわけ、該オリゴマーが細胞内に取込まれ易くするために、之等をカチオン性リボソームや遺伝子導入用に工夫された合成ポリマー等との複合体として製剤化するのが好ましい。ここで用いられるカチオン性リボソームとしては、例えばリポフェクチン(商品名:ギブコ社製)等を、合成ポリマーとしては、例えばスーパーフェクト(商品名:キアゲン社製)等を、それぞれ例示できる。また、遺伝子銃を用いて投与される場合は、金でコーティングした製剤とすることができる。

【0041】ペプチド核酸形態の本発明核酸塩基結合オリゴマーは、上記の如き製剤化を行なわずとも通常の製剤によって、実用できる有利がある。

【0042】更に、上記で調製される医薬製剤組成物中には、通常の緩衝剤、安定化剤、徐放化剤、吸収促進剤等を必要に応じて添加配合することもできる。

【0043】上記医薬製剤組成物中に含有させるべき本発明核酸塩基結合オリゴマーの量は、特に制限されず広範囲より適宜選択されるが、通常医薬製剤組成物中に約1～90重量%程度含有されるものとするのがよい。

【0044】医薬製剤の投与量は、その用法、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度等によりデリバリー

方法を考慮して適宜選択できる。通常有効成分である本発明核酸塩基結合オリゴマーの量が、1日成人体重1kg当り約0.1ng~1mg程度とするのがよく、該製剤は1日に1回もしくは2~4回に分けて投与することができる。

【0045】

【実施例】以下、本発明を更に詳しく説明するため、本発明核酸塩基結合オリゴマーの製造例を実施例として挙げ、次いでそれらを用いた薬理試験例を挙げる。之等の各例は、本発明の一実施態様を示すものであって、本発明は之等の例により何等限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において種々の態様で実施し*

*得るのは勿論である。

【0046】

【実施例1】 DNA形態の本発明核酸塩基結合オリゴマーの製造

自動シンセサイザーとしてABI社製DNA/RNA合成機を用いて、表1に示す試薬を用いてプログラム通りに合成を行なって、前記式(1)に示す核酸塩基の配列の本発明核酸塩基結合オリゴマー(DNA形態)を得た。

【0047】

【表1】

試 薬	メーカ
3' 位にβ-シアノエチル基及び3' 位にシ ⁺ メトキシトリチル基が導入されたdAMP	ABI社
3' 位にβ-シアノエチル基及び3' 位にシ ⁺ メトキシトリチル基が導入されたdCMP	ABI社
3' 位にβ-シアノエチル基及び3' 位にシ ⁺ メトキシトリチル基が導入されたdTMP	ABI社
3' 位にβ-シアノエチル基及び3' 位にシ ⁺ メトキシトリチル基が導入されたdGMP	ABI社
テトラゾール	ABI社
無水酢酸	ABI社
メチルイミダゾール	ABI社
トリクロロ酢酸	ABI社
TETD (テトラエチルチウムジ ⁺ スルフィド ⁻)アセトニトリル溶液	ABI社
アセトニトリル	ABI社

【0048】かくして得られた本発明核酸塩基結合オリゴマーは、高速液体クロマトグラフィー(HPLC、その条件等を表2に示す)の結果、図1(縦軸:ピーク強度(260nmでの吸光度)、横軸:保持時間(分))※

※に示す溶離パターンを示した。その保持時間は18.9分であった。

【0049】

【表2】

カラム	C-18 (5μm球状シリカゲル、4.6mm×250mm)		
検出波長	260nm		
溶離液	A液: 0.1Mトリエチルアミン酢酸溶液(0.5%アセトニトリル含有; pH7.0)		
	B液: アセトニトリル		
溶出条件	時間(分)	0-15	15-30
	A液:B液	95:5	77:23
	流速(ml/分)	1.0	1.0

【0050】また得られた本発明オリゴマーは、³¹P-NMRスペクトル分析の結果、ホスホロチオエートのPのシグナルが、通常のリン酸エステルのPのシグナルよりも低磁場側に1本のみ観察されたことから、100%ホスホロチオエート化されたものであることを確認した。

【0051】

【実施例2】 ペプチド核酸形態の本発明核酸塩基結合オリゴマーの製造

自動シンセサイザーとしてパーセプティブバイオシステムズ社製の自動合成機を用い、表3に示す各モノマーを用いてプログラム通りに反応を行なわせて、前記繰返し単位(2)で表わされるポリアミド骨格構造を有し、該単位(2)中のBの配列が、配列番号:2で示されるものである本発明核酸塩基結合オリゴマーを得た。該配列は、ヒトSCF遺伝子の第3~7コドンの配列に相補的なものである。

【0052】

【表3】

モノマー	CA登録番号(RN)	メーカー
Fmoc-ac-Gly(A-Bhoc)-OH	186046-82-2	パナセア・ティファ・バイオシステムズ社
Fmoc-ae-Gly(G-Bhoc)-OH	186046-83-3	パナセア・ティファ・バイオシステムズ社
Fmoc-ae-Gly(C-Bhoc)-OH	186046 81-1	パナセア・ティファ・バイオシステムズ社
Fmoc-ae-Gly(T)-OH	169396-92-3	パナセア・ティファ・バイオシステムズ社

【0053】尚、表中、Fmoc-aeは、その後の結合するグリシン(-Gly)の窒素原子に2-[N-(9H-フルオレン-9-イル)]アミノエチル基が結合していることを示す。また、Gly(A-Bhoc)-OHは、グリシンの窒素原子上に、アミノ基をジフェニルメトキシカルボニル基(Bhoc)で保護されたアデニン(A-Bhoc)が、アセチル基を介して結合していることを示す。Gly(G-Bhoc)-OH及びGly(C-Bhoc)-OHは、同様に、グリシンの窒素原子上に、アミノ基をジフェニルメトキシカルボニル基で保護されたグアニン(G)及びシトシン(C)がそれぞれ、アセチル基*

10 *を介して結合していることを示す。また、Gly(T)-OHは、グリシンの窒素原子上に、チミン(T)が、アセチル基を介して結合していることを示す。

【0054】かくして得られたペプチド核酸形態の本発明核酸塩基結合オリゴマーは、高速液体クロマトグラフィー(HPLC、その条件等を表4に示す)の結果、図2に示す溶離パターン(縦軸:ピーク強度(mV)、横軸:保持時間(分))を示した。

【0055】

【表4】

カラム	C-18 300 Å 温度50℃ 5 µm球状シリカゲル、3.9 mm×150 mm		
検出波長	254 nm		
溶離液	A液: 0.1%トリフルオロ酢酸溶液		
	B液: 0.08%トリフルオロ酢酸アセトニトリル		
溶出条件	時間(分)	0-5	5-35
	A液:B液	100:0	65:35
	流速(ml/分)	1.0	1.0

【0056】また、マトリックス補助レーザー脱離フライト時間質量分析(MALDI-TOFマスペクトル)(マトリックス:シナピン酸)による分析の結果、図3(縦軸:カウント数、横軸:Mass(m/z), (M+H)⁺)に示すように、4057.47に(M+H)⁺のピークが観察された(理論値=4058.91)。

【0057】

【薬理試験例1】 SCF合成阻害作用

SCFを産生することが知られている培養細胞BALB/3T3 A31クローン(J. Cell Physiol., 88(3), 277(1976))よりRNAを抽出し、RT-PCR(Reverse transcribed-Polymerase chain reaction; E.S. Kawasaki, et al., Amplification of RNA. In PCR Protocol, A Guide to methods and applications, Academic Press, Inc, San Diego, 21-27 (1991))によってSCFの遺伝子のみを増幅させた。このPCR産物とRNAポリ

30 リメラーゼ(T7)のプロモーター領域を結合(ライゲーション)し、これを更にPCRで増幅させることによって、RNAポリメラーゼプロモーター領域を含むSCF遺伝子を調製した。この遺伝子から、mCAP RNAキャッピングキット(STRATAGEN社製)を用いてRNA合成を行なって、SCFのRNA基質とした。

【0058】次いで、上記で得たRNA 1 µgを、総反応用量50 µgのIn vitroトランスレーションシステム(アマシャム社製、表5にその組成を記載する)に加え、更にRNase H(宝酒造社製)を、1.2 U/µlの濃度となるように加え、同時に実施例1で得られた本発明核酸塩基結合オリゴマーの所定量を添加し、30℃で30分間インキュベートした後、ビオチン修飾された蛋白質の合成量を以下の方法により測定した。

【0059】

【表5】

成 分	濃 度
ジチオスレイトール	2 mM
N-2-ヒト [*] ロキシエチルヒ [*] ヘ [*] ラジ [*] ソ-N [*] -2-エタノールモノ酸	20 mM
クレアチンリン酸	8 mM
酢酸カリウム	100 mM
酢酸マグネシウム	1 mM
ビオチン標識リジン-tRNA	25 mM
アミノ酸 (Trp, Leu, Val, Thr, Phe, Met, Ile, Arg, His, Pro, Ser, Cys, Tyr, Ala, Gly, Asp, Gln, Asn, Glu)	各 25 mM
ウサギ網状赤血球ライセート	20 w/v%

【0060】即ち、SDS-PAGE電気泳動後、蛋白質を膜にトランスブロットし、更にHRP（西洋ワサビパーオキシダーゼ）標識されたストレプトアビジンを結合させてECL検査法（Anal. Biochem., 206(2), 267 (1992)）によりビオチン標識された蛋白質を検出した。20 感光させたポラロイドフィルムに現われた電気泳動バンドを画像解析ソフトNIHイメージで解析し、そのバンド面積より、合成された蛋白質を定量した。検体を加えない場合の蛋白質の合成量を基準（100%）として、検体を加えたときの蛋白質合成抑制効果を百分率で求めた。

【0061】尚、対照として、本発明核酸塩基結合オリゴマーの代わりにシクロヘキシミド（シグマ社製）を添加して同様の操作を行なって得られる結果を求めた。

【0062】結果を図4（縦軸：SCF相対量（%）、横軸：投与量（nM））に示す。図中の各値は、同一試験を3回繰り返して得られた測定値の平均値である。30

【0063】図4より、本発明核酸塩基結合オリゴマーは、モル濃度での比較において、シクロヘキシミドより約4倍SCF蛋白質合成の抑制効果が高いことが判った。

【0064】また、本発明核酸塩基結合オリゴマーの蛋

白質選択性を検討するために、SCFの代わりにBMV（Brome Mosaic Virus）由来のRNA（Bull. Soc. Fr. Ph. Physiol. Veg., 12(4), 299(1966)）を用いて、上記と同様に無細胞転写翻訳系を調製し、該系におけるBMV蛋白質合成に対する本発明核酸塩基結合オリゴマーの影響を検討した。

【0065】その結果を図4と同様にして図5（縦軸：相対蛋白量（%）、横軸：本発明結合オリゴマー濃度（nM））に示す。

【0066】図5に示される通り、本発明核酸塩基結合オリゴマーのSCF以外の蛋白質に対する抑制効果は、SCFの約1/20～1/50倍程度と非常に低く、このことから本発明核酸塩基結合オリゴマーはSCFに対する選択性の高いものであることが明らかとなった。

【0067】更に、実施例2で得られた本発明結合オリゴマーについて、上記と同一試験を行なった結果、上記とほぼ同様の結果が得られた。

【0068】以上のことから、本発明核酸塩基結合オリゴマーは、肥満細胞の遊走、接着、分化増殖因子であるSCF蛋白質を選択的に抑制することが確認された。

【0069】

【配列表】

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: Ostuka Pharmaceutical Factory, Inc.

(ii) TITLE OF INVENTION: 核酸塩基結合オリゴマー

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 2

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER:

(B) FILING REFERENCE: 12E8JP

(C) FILING DATE: 22-June-1998

【0070】

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA(cDNA)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

ATGAAGAAGA CACAACTTG G

21

【0071】

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other DNA (synthetic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

CCAAGTTTGT GTCTTCTTCA T

21

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で得た本発明核酸塩基結合オリゴマーのHPLCによる溶離パターンを示すグラフである。

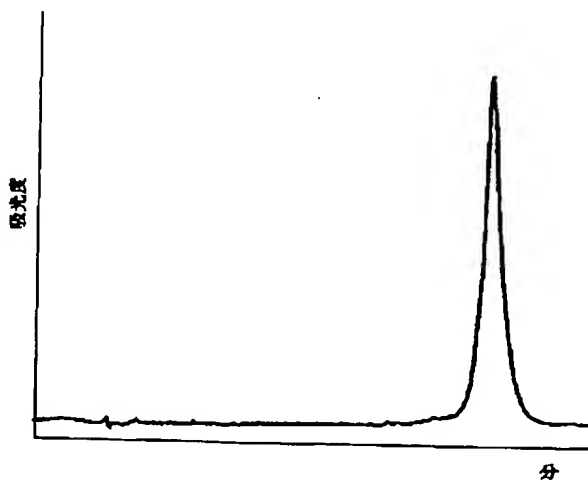
【図2】実施例2で得られた本発明核酸塩基結合オリゴマーのHPLCによる溶離パターンを示すグラフである。

【図3】実施例2で得られた本発明核酸塩基結合オリゴマーの質量分析結果を示すグラフである。

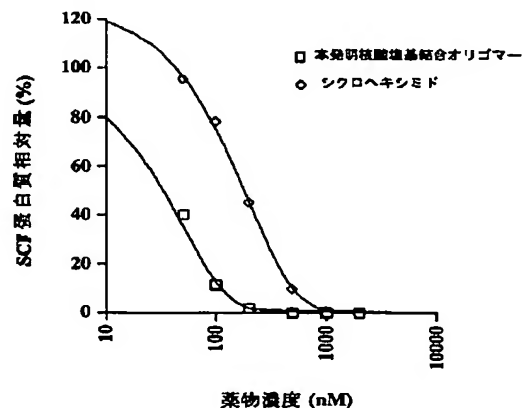
【図4】本発明核酸塩基結合オリゴマーのSCF合成の抑制効果を明らかにするグラフである。

【図5】BMV蛋白合成に対する本発明核酸塩基結合オリゴマーの影響を検討した結果を示すグラフである。

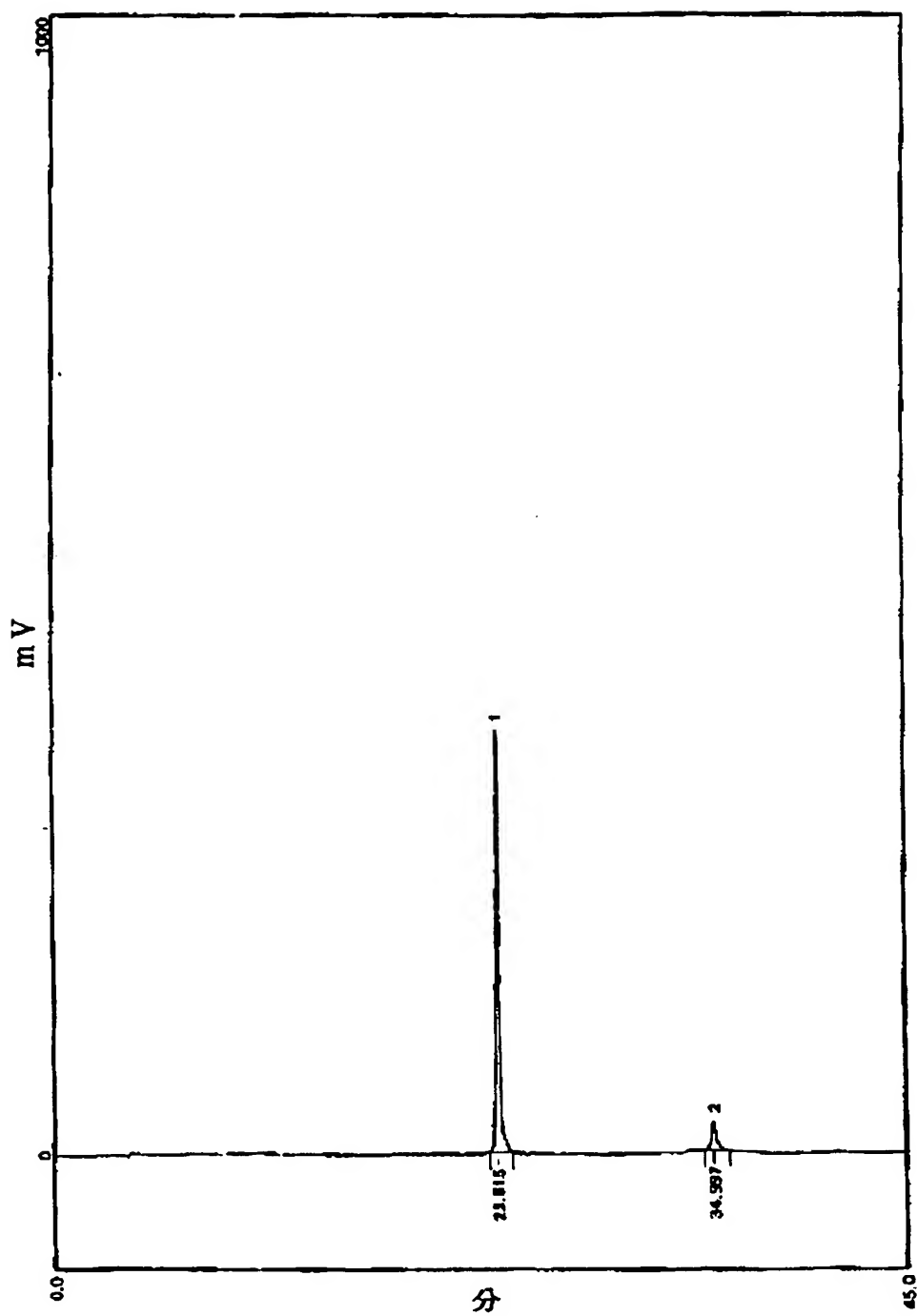
【図1】



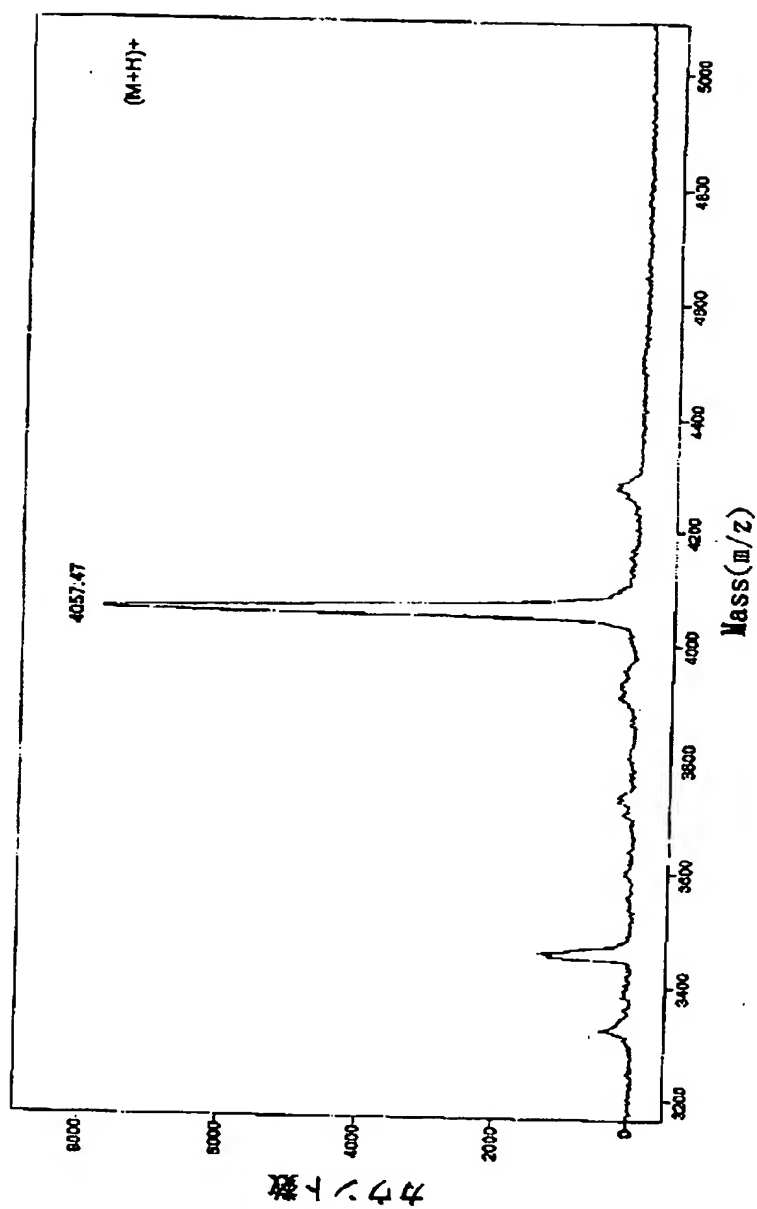
【図4】



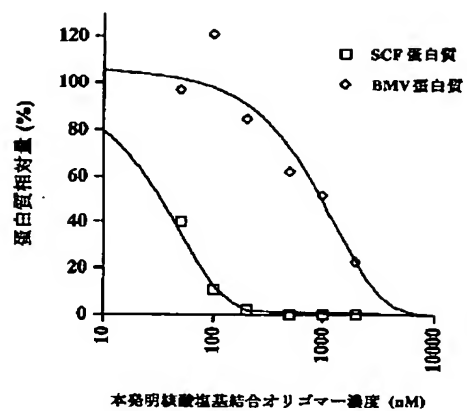
【図2】



【図3】



【図5】



フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA21 CA01 CA06 CA11
 CA12 GA13 HA17 HA20
 4C084 AA07 AA13 BA02 BA35 MA13
 MA63 NA05 NA06 ZA892
 ZB132
 4C086 AA03 EA16 NA05 NA06 ZA89
 ZB13